

REC'D 29 APR 2004

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号	P 0 2 0 3 1 0 2	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号	PCT/J P 0 3 / 1 1 1 3 4	国際出願日 (日.月.年)	0 1 . 0 9 . 2 0 0 3
		優先日 (日.月.年)	0 3 . 0 9 . 2 0 0 2
国際特許分類 (IPC) I n t . C l . 7 C12N15/09, C12N5/10, A01K67/027			
出願人 (氏名又は名称) 独立行政法人科学技術振興機構。			

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で 10 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 1 0 . 1 2 . 2 0 0 3	国際予備審査報告を作成した日 1 5 . 0 4 . 2 0 0 4		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  七條 里美	4 B	2 9 3 6
電話番号 03-3581-1101 内線 3448			

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

- ☒ 明細書 第 1-68 ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 請求の範囲 第 3-7, 14, 25-29, 31-34, 39-45, 50 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 1-2, 13, 17-18, 23-24, 35-38, 52, 54, 56 項、 17.03.2004 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 図面 第 1-19 ページ、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 明細書の配列表の部分 第 1-22 ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出された磁気ディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された磁気ディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列と磁気ディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☒ 請求の範囲 第 8-12, 15-16, 19-22, 30, 46-49, 51, 53, 55 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-7, 13-14, 17-18, 23-29, 31-45, 50, 52, 54, 56	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-7, 13-14, 17-18, 23-29, 31-45, 52, 54, 56	有
	請求の範囲	50	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-7, 13-14, 17-18, 23-29, 31-45, 50, 52, 54, 56	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : EMBO Rep, 2001, Vol. 2, No. 10, pp. 910-914  
 文献2 : 戦略的基礎研究推進事業研究年報, 2002年3月, Vol. 2000, pp. 61-64  
 文献3 : 実験医学, 2001, Vol. 19, No. 1, pp. 50-52  
 文献4 : FEBS Lett. 2002 Jun, Vol. 520, No. 1-3, pp. 47-52  
 文献5 : J Virol, 2000, Vol. 74, No. 10, pp. 4679-4687  
 文献6 : 細胞, 2001, Vol. 33, No. 3, pp. 114-117

請求の範囲 50

請求の範囲 50 に記載された発明は国際調査報告で引用した文献1-5に対して進歩性を有しない。

文献1には、アルフォイド配列を有するPACと、導入遺伝子を有するPACをヒト細胞に導入し、哺乳類人工染色体を保持する細胞を取得できることが記載されている。

文献2には、50 kbのアルフォイド配列を含むヒト人工染色体を形成する際に用いるベクターが記載されている。また、該ベクターにloxPサイトを付加することについても記載されている。

また、文献3にも記載されるように、特定の位置に目的の遺伝子を挿入しようとする際に、loxP等の挿入配列を用いることは、当該技術分野の専門家がよく行うことであるから、文献1, 2に記載された発明において、用いるベクターにloxPサイトを設けることに格別の困難性は認められない。

さらに、文献4-5には、遺伝子を導入する際のベクターにインスレーター配列を用いると位置の影響を減少させることができることが記載されているから、用いるベクターにさらにインスレーター配列を導入し、位置の影響を減少させて目的遺伝子が効率的に発現するようにすることに格別の困難性は認められない。

そして、本願発明においては、アルフォイド配列を有する第一ベクターと、挿入用配列としてのloxP部位を有し、かつインスレーターを有する第二ベクターを用意し、二つのベクターを宿主細胞に共導入し、宿主細胞内で組換えを生じさせることで、人工染色体を構築することができるという効果を奏するものであるもので、単に、挿入用配列とインスレーターを含むというだけでは、上記のような効果を奏するものとは認められない。よって、請求の範囲50に記載された発明の構成を採ることにより格別顕著な効果が奏されたとは認められない。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

請求の範囲 1-7, 13-14, 17-18, 23-29, 31-45, 52, 54, 56

請求の範囲 1-7, 13-14, 17-18, 23-29, 31-45, 52, 54, 56 に記載された発明は、国際調査報告で引用した文献 1-6 に対して、新規性及び進歩性を有する。

アルフォイド配列を有する第一ベクターと、挿入用配列としての loxP 部位を有し、かつインスレーターを有する第二ベクターを宿主細胞に共導入し、宿主細胞内で組換えを生じさせることで、人工染色体を構築することができることについては、上記いずれの文献にも記載されていないし、その点は当該技術分野の専門家にとって自明のことであるとも認められない。

## 請 求 の 範 囲

1. (補正後) 哺乳類セントロメア配列を含む環状の第1ベクターと、所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列及びインスレーター配列を含む環状の第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、  
5 形質転換細胞を選択する第2工程と、及び  
選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、  
を含むことを特徴とする哺乳類人工染色体の作製方法。
- 10 2. (補正後) 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列及びインスレーター配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、  
15 形質転換細胞を選択する第2工程と、及び  
選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、  
を含むことを特徴とする哺乳類人工染色体の作製方法。
- 20 3. 前記第1ベクターが選択マーカー遺伝子を有し、前記第2工程における形質転換細胞の選択は該選択マーカー遺伝子を利用して行われる、請求の範囲第1又項は第2項に記載の作製方法。
4. 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列さ  
25 れる領域を含む、請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載の作製方法、

5'-NTTCGNNNNANNCGGGN-3' : 配列番号 1 (但し、N は A, T, C, 及び G のいずれかである)。

5. 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由来の配列を含む、請求の範囲第 1 項～第 4 項のいずれかに記載の作製方法。

6. 前記哺乳類セントロメア配列はヒト 21 番染色体由来の 11 量体繰返しユニットを含む、請求の範囲第 5 項に記載の作製方法。

10 7. 前記哺乳類セントロメア配列のサイズは約 50kb 以下である、請求の範囲第 1 項～第 6 項のいずれかに記載の作製方法。

8. (削除)

15 9. (削除)

10. (削除)

11. (削除)

20

12. (削除)

13. (補正後) 前記挿入用配列が loxP サイト若しくは FRT サイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列である、請求の範囲第 1 項～第 7 項のいずれかに記載の作製方法。

25

14. 前記第1工程において導入する、前記第1ベクターと前記第2ベクターの量比はモル比で約10:1～約1:10の範囲にある、請求の範囲第1項～第13項のいずれかに記載の作製方法。

5

15. (削除)

16. (削除)

10 17. (補正後) 請求の範囲第1項～第16項のいずれかに記載の作製方法によって得られ、

哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、並びに所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列及びインスレーター配列を有し、

15 環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

18. (補正後) 請求の範囲第1項～第16項のいずれかに記載の作製方法によって得られ、

20 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、並びに所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列及びインスレーター配列を有し、

線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

19. (削除)

25

20. (削除)

21. (削除)

5 22. (削除)

23. (補正後) 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、並びに所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列及びインスレーター配列を有し、

環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

24. (補正後) 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、並びに所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列及びインスレーター配列を有し、

15 線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

25. 前記挿入用配列が loxP サイト若しくは FRT サイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列である、請求の範囲第23項又は第24項に記載の作製の哺乳類人工染色体。

26. 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列される領域を含む、請求の範囲第17項～第25項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体、

25 5'-NTTCGNNNNANNCGGG-3' : 配列番号1 (但し、NはA、T、C、及びGのいずれかで



ある)。

27. 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由来の配列を含む、請求の範囲第17項～第25項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体。

28. 前記哺乳類セントロメア配列はヒト21番染色体由来の11量体繰返しユニットを含む、請求の範囲第27項に記載の哺乳類人工染色体。

29. 前記挿入用配列及び前記インスレーター配列を複数個有する、請求の範囲第17項～第28項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体。

30. (削除)

31. 請求の範囲第17項～第30項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有する哺乳類細胞。

32. 請求の範囲第17項～第30項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有するヒト細胞。

20

33. 請求の範囲第17項～第30項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有する胚性幹細胞。

34. 請求の範囲第1項～第16項のいずれかに記載の作製方法によって得られる哺乳類人工染色体又は請求の範囲第17項～第30項のいずれかに記載の哺

乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する工程を含む、

ことを特徴とする、前記機能配列又は前記挿入用配列が長期間安定して維持可能な状態に導入された哺乳類細胞の作製方法。

- 5     35. (補正後) 哺乳類セントロメア配列を含む環状の第1ベクターと、所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列及びインスレーター配列を含む環状の第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、
- 形質転換細胞を選択する第2工程と、
- 選択された形質転換細胞の中から、哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、
- 10    選択された細胞から前記哺乳類人工染色体を分離する第4工程と、及び
- 分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する第5工程と、
- を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

15

36. (補正後) 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列及びインスレーター配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、
- 20    形質転換細胞を選択する第2工程と、
- 選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、
- 選択された細胞から前記哺乳類人工染色体を分離する第4工程と、及び
- 分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する第5工程と、
- 25

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

37. (補正後) 哺乳類セントロメア配列を含む環状の第1ベクターと、所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列及びインスレーター配列を含む環状の
- 5 第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、
- 形質転換細胞を選択する第2工程と、
- 選択された形質転換細胞の中から、哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、
- 選択された細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞とを融合させる第4工程
- 10 と、
- 融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有するハイブリッド細胞を選択する第5工程と、及び
- 選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる第6工程と、
- を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

15

38. (補正後) 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列及びインスレーター配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、
- 20 形質転換細胞を選択する第2工程と、
- 選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、
- 選択された細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞とを融合させる第4工程と、
- 25 融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有す

るハイブリッド細胞を選択する第5工程と、及び

選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる第6工程と、  
を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

- 5    39.    請求の範囲第37項又は第38項に記載の作製方法によって得られる微小核体とターゲット細胞としての哺乳類細胞とを融合させる工程、  
を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

40.    請求の範囲第17項～第30項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を  
10    保有する宿主細胞から哺乳類人工染色体を分離する工程と、及び  
分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する工程と、  
を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

- 15    41.    請求の範囲第17項～第30項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を保有する宿主細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞と、を融合させる工程と、  
融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有するハイブリッド細胞を選択する工程と、及び  
選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる工程と、  
20    を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

42.    請求の範囲第41項に記載の作製方法によって得られる微小核体とターゲット細胞としての哺乳類細胞とを融合させる工程、  
を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

- 4 3. 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、又は組織幹細胞である、請求の範囲第34項、第35項、第36項、第39項、第40項、及び第42項のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。
- 5 4 4. 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、又は組織幹細胞を、特定の組織の細胞へと分化するように誘導してなる細胞である、請求の範囲第34項、第35項、第36項、第39項、第40項、及び第42項のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。
- 10 4 5. 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、哺乳類の受精卵である、請求の範囲第34項、第35項、第36項、第39項、第40項、及び第42項のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。
- 4 6. (削除)
- 15 4 7. (削除)
- 4 8. (削除)
- 20 4 9. (削除)
- 5 0. 哺乳類人工染色体の作製に使用されるベクターであって、  
loxPサイト若しくはFRTサイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列と、  
25 インスレーター配列と、を含むベクター。

5 1. (削除)

5 2. (補正後) 請求の範囲第 1 7 項～第 1 9 項のいずれかに記載の哺乳類人工  
5 染色体が導入されてなる、非ヒト形質転換動物。

5 3. (削除)

5 4. (補正後) 請求の範囲第 1 7 項～第 1 9 項のいずれかに記載の哺乳類人工  
10 染色体が導入されてなる、X0 型マウス胚性幹細胞。

5 5. (削除)

5 6. (補正後) 請求の範囲第 1 7 項～第 1 9 項のいずれかに記載の哺乳類人工  
15 染色体が導入されてなる、メスキメラマウス。

Translation

Rec'd PCT/PTO 03 MAR 2005

PCT/JP2003/011134

PATENT COOPERATION TREATY

PCT 10/526425



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P0203102	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP2003/011134	International filing date (day/month/year) 01 September 2003 (01.09.2003)	Priority date (day/month/year) 03 September 2002 (03.09.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/09, 5/10, A01K 67/027		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.  <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of <u>10</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 10 December 2003 (10.12.2003)	Date of completion of this report 15 April 2004 (15.04.2004)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP2003/011134

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-68, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages 3-7,14,25-29,31-34,39-45,50, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages 1-2,13,17-18,23-24,35-38,52,54,56, filed with the letter of 17 March 2004 (17.03.2004)
- ☒ the drawings:  
pages 1-19, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the sequence listing part of the description:  
pages 1-22, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☒ the claims, Nos. 8-12,15-16,19-22,30,46-49,51,53,55
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP03/11134

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7, 13-14, 17-18, 23-29, 31-45, 50, 52, 54, 56	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-7, 13-14, 17-18, 23-29, 31-45, 52, 54, 56	YES
	Claims	50	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7, 13-14, 17-18, 23-29, 31-45, 50, 52, 54, 56	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: EMBO Rep, 2001, Vol. 2, No. 10, pages 910-914

Document 2: Annual Research Report of Strategic Basic Research Promotion Project, March 2002, Vol. 2000, pages 61-64

Document 3: Experimental Medicine, 2001, Vol. 19, No. 1, pages 50-52

Document 4: FEBS Lett., 2002, June, Vol. 520, Nos. 1-3, pages 47-52

Document 5: J Virol, 2000, Vol. 74, No. 10, pages 4679-4687

Document 6: Cell, 2001, Vol. 33, No. 3, pages 114-117

#### Claim 50

The subject matter of claim 50 does not appear to involve an inventive step in view of documents 1-5 cited in the ISR.

Document 1 describes that cells having artificial mammalian chromosomes can be obtained by transferring (a) PAC having an alphoid sequence and (b) PAC having transgenes into human cells.

Document 2 also describes a vector having an alphoid sequence of 50 kb that is used in forming artificial human chromosomes, and that a loxP site is added to the said vector.

As described in document 3, using an inserted sequence such as loxP in inserting a target gene at a particular site is a usual method used by a person skilled in the art in the relevant technical field, and so there would have been no particular difficulty in providing a loxP site in a vector to be used.

Furthermore, documents 4 and 5 describe that using an insulator sequence in a vector to transfer genes reduces the effect of the position, and so there would have been no particular difficulty in transferring an insulator sequence in addition into a vector to be used to reduce the effect of the position so that the target gene can be expressed efficiently.

The invention of the present application is that (1) a first vector having an alphoid sequence and (2) a second vector having (a) an loxP site to be inserted and (b) an insulator are prepared, and those vectors are co-transferred into host cells so that recombination can take place that has an effect of forming artificial chromosomes. Therefore, it is not considered that simply containing a sequence to be inserted and an insulator has such an effect. Accordingly, it is not considered that the invented constitution described in claim 50 has a significant effect.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/JP03/11134

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of : V.2

Claims 1-7, 13, 14, 17, 18, 23-29, 31-45, 52, 54 and 56

The subject matters of claims 1-7, 13, 14, 17, 18, 23-29, 31-45, 52, 54 and 56 appear to be novel and to involve an inventive step in view of documents 1-6 cited in the ISR.

It is neither described in any of the above-mentioned documents nor obvious to a person skilled in the art that (1) a first vector having an alphoid sequence and (2) a second vector having (a) an loxP site to be inserted and (b) an insulator are co-transferred into host cells so that recombination can take place in the host cells whereby artificial chromosomes can be formed.